

THESIS

TÜBINGEN

1967 v

Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. Hans Roemer

---

Über die Heterogenität  
der sogenannten Leucinaminopeptidase (LAP)  
im Ovarium vom Schwein

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Ulrich Mahler  
aus Bielefeld

1967

9005

LANE MEDICAL LIBRARY OF  
STANFORD UNIVERSITY  
300 PASTEUR  
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA40153517\\_0042](https://archive.org/details/IA40153517_0042)

Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. Hans Roemer

---

Über die Heterogenität  
der sogenannten Leucinaminopeptidase (LAP)  
im Ovarium vom Schwein

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Ulrich Mahler  
aus Bielefeld

1967

Dekan: Professor Dr. med. F. Lembeck

1. Berichterstatter: Dozent Dr. med. G. Jung
2. Berichterstatter: Professor Dr. med. H. Roemer

Meinen Eltern, die mir ein Studium ermöglichten,  
in Dankbarkeit gewidmet.



Herrn Doz. Dr. G. Jung danke ich für die Über-  
lassung des Themas und Herrn Dr. med V. Unbehaun  
bin ich für seine freundliche Unterstützung bei  
der Durchführung der Arbeit zu herzlichem Dank  
verpflichtet.



## I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

|                                                       | Seite |
|-------------------------------------------------------|-------|
| I. Einleitung                                         | 1     |
| II. Biochemische Charakterisierung der LAP            | 1     |
| III. Vorkommen und Bedeutung der LAP                  | 1     |
| IV. Klinische Bedeutung der LAP                       | 2     |
| V. Heterogenität der LAP                              | 2     |
| VI. Methodik                                          | 4     |
| VII. Ergebnisse                                       | 9     |
| 1. Versuchsprotokolle der untersuchten<br>Gewebearten | 9     |
| 2. Die prozentuale Verteilung der Aktivität           | 20    |
| 3. Die Verteilung der spezifischen Aktivität          | 22    |
| 4. Hemmung und Aktivierung der LAP                    | 24    |
| VIII. Diskussion                                      | 25    |
| IX. Zusammenfassung                                   | 28    |
| X. Literaturverzeichnis                               | 29    |
| XI. Lebenslauf                                        | 32    |



## EINLEITUNG

In den verschiedenen Anteilen des Ovariums sind von JUNG u. Mitarb. (14) eine Reihe von Enzymen untersucht worden. Unter anderem wurde dabei auch die Aktivität eines L-Leucyl- $\beta$ -Naphthylamin (LEUNA)-spaltenden Enzyms beschrieben, das in Übereinstimmung mit anderen Autoren als Leucinaminopeptidase (LAP) bezeichnet wurde. Dabei handelt es sich um ein Enzym, das von einer Peptidkette ein endständiges Leucin-Molekül abspaltet, also um eine Exopeptidase. Besonders hohe Aktivität dieses Enzyms fand SCHWÄGERLE (30) im Corpus luteum des Schweineovars.

## BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER L A P

SPACKMAN u. SMITH (35) haben erstmals eine hochgereinigte LAP aus Schweineleiere isoliert. Sie konnten das Enzym 1600fach anreichern und fanden auf Grund der Sedimentationskonstanten ein Molekulargewicht von 300 000. Das Enzym ließ sich mit  $Mn^{++}$ ,  $Mg^{++}$  und  $Co^{++}$  aktivieren (38) und fand sich verhältnismäßig unspezifisch. Säureamide, Di- und Tripeptide und auch längere Polypeptide wurden mit verschiedener Geschwindigkeit gespalten (31). Optimale Substrate sind L-Leucinamid, L-Leucylglycin, L-Leucyl-glycyl-glycin, L-Leucyl- $\beta$ -Naphthylamin (8,32). Der Name Leucinaminopeptidase stammt von LINDERSTØM (18), der das Enzym zum erstenmal im Darmerepsin nachwies.

## VORKOMMEN UND BEDEUTUNG DER L A P

Bei weiteren Untersuchungen fand sich dieses Enzym LAP weitverbreitet in menschlichen Geweben und Körperflüssigkeiten (10, 26). Die Bedeutung der LAP innerhalb des Stoffwechsels ist noch nicht bekannt. Wahrscheinlich bewirkt sie die Aufspaltung einer Peptidbindung in der Nähe eines L-Leucinrestes, oder die Übertragung von einem Peptidmolekül auf ein anderes. Damit wäre sie an der Endphase der Eiweißaufspaltung mitbeteiligt (9).

## KLINISCHE BEDEUTUNG DER L A P

Nach RETTENBACH-DÄUBNER (25) ist die LAP vorwiegend bei jenen Krankheiten erhöht, bei denen es zu Nekrosen von Leberzellen oder zur Cholestase kommt, also bei Hepatitis, bei extra- oder intrahepatischen Verschlußikterus und bei Lebertumoren. Die LAP kann im Rahmen der übrigen Befunde zur Diagnosestellung beitragen, so bei intrahepataler Cholestase, beim kurzdauernden oder geringgradigen mechanischen Ikterus und bei mancher subikterischen, akuten Hepatitis. Zur Differentialdiagnose zwischen parenchymatösen und benignem oder malignem Verschlußikterus kann sie nicht herangezogen werden.

## HETEROGENITÄT DER L A P

Von vielen Autoren ist die LAP-Aktivität auf das Vorliegen von Isozymen hin untersucht worden. Hierbei wurden chromatographische und elektrophoretische Fraktionierungsmethoden angewandt (1,2,4,6,9,17,19,28,33,34,37). Dabei sind die einzelnen Autoren zu voneinander abweichenden Ergebnissen gekommen. So beobachteten MEADE u. ROSALKI (19), SMITH u. RUTENBURG (34), SMITH, PINEDA u. RUTENBURG (33), KOWLESSAR, HAEFFNER u. SLEISENGER (17) im Serum bei elektrophoretischer Auftrennung nur eine aktive Bande. SCHOBEL u. WEWALKA (28) fanden elektrophoretisch ein bis zwei Banden. BEHAL, KANAVAGE u. HAMILTON (1) trennten die LAP-Aktivität im Serum säulenchromatisch an DEAE-Cellulose auf. Dabei ließen sich im normalen Serum, im Gegensatz zu den Beobachtungen bei der Elektrophorese (17,19,33,34), vier Fraktionen mit LAP-Aktivität nachweisen. Bei Erkrankungen im Bereiche der Leber, der Gallenwege, des Pankreas, bei der Gravidität und bei Hautkrankheiten fand sich die LAP-Aktivität erhöht und in mehrere Fraktionen auftrennbar (2,6,17,27,28,29,37).

SMITH, PINEDA u. RUTENBURG (33) fanden in normalen Seren die LAP-Aktivität im Bereich der  $\alpha_2$ -Globuline. Die Verteilung beim Verschlußikterus zeigt Abhängigkeit von der Genese. Bei den

meisten Patienten mit Pankreaskopfcarcinom vor der Operation kann ein weiterer Gipfel in der Gegend der  $\beta$ -Globuline und etwa 10% ein dritter an der Auftragsstelle beobachtet werden. Die Serumaktivität geht postoperativ parallel mit dem  $\beta$ -Globulingipfel zurück. Bei Steinverschluß zeigt sich außer dem  $\alpha$ -Gipfel noch ein solcher im Gebiet des Albumins, bei Hepatiden entweder in der  $\alpha_2$ - oder  $\beta$ -Region, beim Albumin und an der Auftragsstelle. Das Wiederauftreten nur im  $\alpha_1$ -Gebiet geht parallel mit der Abnahme der Gesamtaktivität im Serum und mit der klinischen Besserung. Acht von zehn Patienten mit Lebergeschwülsten oder Lebermetastasen zeigten einen zusätzlichen  $\beta$ -Gipfel, fünf einen weiteren an der Auftragsstelle und zwei im Albuminbereich und an der Auftragsstelle, die übrigen nur einen zusätzlichen im  $\alpha_2$ -Gebiet. Anikterische Patienten mit chronischer Pankreatitis bei normaler Gesamtaktivität im Serum zeigten nur den  $\alpha_1$ -Gipfel, drei von acht anikterischen Patienten mit Lebermetastasen ebenfalls, vier weitere zusätzliche Aktivität im Bereich von  $\beta$ -Globulin (zwei davon noch im Albumingebiet) und ein Patient im  $\alpha_2$ -Bereich und an der Auftragsstelle. Die Verteilung der Aktivität ist abhängig vom Vorliegen eines Ikterus. Anikterische Patienten weisen nur Aktivität im  $\alpha_1$ -Bereich auf, während bei Ikterus auch die Aktivität im  $\alpha_2$ -Bereich und/oder  $\beta$ -Gebiet beobachtet werden kann. Zu Beginn einer Schwangerschaft liegt eine normale Aktivitätsverteilung vor, gegen Ende wird die Aktivität in dem  $\alpha_1$ -Bereich verschoben. Gleichzeitig nimmt die Serumaktivität im gesamten zu. Allgemein läßt sich bei den Erkrankungen der Leber und Gallenwege eine erhebliche Zunahme der Gesamtaktivität erkennen, insbesondere beim Vorliegen eines Ikterus.

Andere Autoren beobachteten zwar insgesamt eine Erhöhung der Aktivität, aber keine Verschiebung innerhalb der von ihnen aufgetrennten LAP-Fraktionen (1). Die Ergebnisse der einzelnen Autoren variieren so stark, daß eine Verwendung der LAP zur Differentialdiagnose von Erkrankungen im Leber-Galle-Pankreas-Bereich noch sehr fraglich ist (19,25).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob es sich bei der im Ovarium festgestellten LAP-Aktivität um ein

einheitliches Enzym handelt oder ob auch hier Heterogenität der Aktivität - Isozyme - vorliegen.

#### METHODIK

Ovarien frischgeschlachteter Schweine wurden sofort eisgekühlt und aufgearbeitet oder aber maximal bis zu einer Woche im Tiefkühlfach eingefroren aufbewahrt und dann verwendet.

Liquor folliculi wurde durch Punktion der Follikel frischer Ovarien gewonnen. Die Unterscheidung in junge Tertiärfollikel und sprungreife Follikel wurde nach der Größe getroffen (13). Follikel bis zu 3 mm Durchmesser zählten wir dabei zu den jungen Tertiärfollikeln, die über 8 mm Durchmesser bezeichneten wir als reife Follikel. Von dem Punktat wurden Zelltrümmer und Erythrozyten durch Zentrifugieren 30 min lang bei 60 000 g in der Kühlzentrifuge (Beckman-Spinco) abgeschleudert. Der Überstand wurde zur Untersuchung verwandt.

Corpora rubra, Corpora lutea und Corpora albicantia wurden vorsichtig aus den Ovarien herauspräpariert, mit 0,05 M Kalium-Phosphat-Puffer vom pH = 7,2 auf das Dreifache des Ausgangsgewichtes aufgefüllt, mit dem Homogenisator nach POTTER und ELVEJHEN homogenisiert und anschließend Zellen und Partikel durch Zentrifugation in der Kühlzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde zu den Untersuchungen verwendet.

Die säulenchromatographische Auftrennung des Überstandes erfolgte an DEAE Sephadex A-50 (Deutsche Pharmacia, Frankfurt/M.). Das Gel wurde entsprechend der Vorschrift der Herstellerfirma durch Quellen mit reichlich Wasser, Behandeln mit 0,5 n HCl, anschließend mit 0,5 n NaOH, Waschen mit Aqua dest. vorbereitet und mit dem verwandten Puffer äquilibriert. Das Gel wurde in einem Chromatographierohr von 0,9 cm Durchmesser zu einem Gelbett von 10 cm Höhe sedimentiert. Die Säule wurde durch einen Kühlmantel mit Leitungswasser gekühlt. Mit einer Pipette wurde 3 - 6 ml des Überstandes auf das Gelbett aufgetragen,

anschließend eluiert. Wir führten eine Stufenelution durch:

- I 0,05 M Kalium-Phosphat-Puffer (pH = 7,2)
- II 0,05 M NaCl in 0,05 M K-Phosphat-Puffer
- III 0,10 M NaCl in 0,05 M K-Phosphat-Puffer
- IV 0,20 M NaCl in 0,05 M K-Phosphat-Puffer
- V 0,50 M NaCl in 0,05 M K-Phosphat-Puffer.

Das Elutionsvolumen betrug jeweils 50 ml. Die Fraktionen wurden in einem Fraktionssammler (Radi Rac Fraction Collector Type 3402 B) zu jeweils 5 ml aufgefangen, sofort gekühlt und der Proteingehalt und die Aktivität getestet.

Der Proteingehalt in Ausgangsmaterial und Fraktion wurde durch Messung der Extinktion im Spektralphotometer bei 280 m $\mu$  (Zeiss PMQ II 2693) ermittelt und wegen des hohen Gehaltes an Nucleinsäuren, vor allem bei Corpora lutea, Corpora rubra und Corpora albicantia, durch zusätzliche Messung bei 260 m $\mu$  nach der Formel

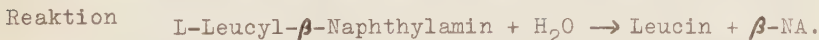
$$E_{280} \cdot 1,55 - E_{260} \cdot 0,76 = \text{mg Prot/ml} \quad (15)$$

korrigiert. Bei den verdünnten Fraktionen nahmen wir wie GRIMM und DOHERTY (11) für einen Proteingehalt von 1 mg Prot pro ml bei 1 cm Schichtdicke eine Extinktion von 1 bei 280 m $\mu$  an.

Die sogenannte LAP-Aktivität wurde mit dem LAP-Test nach BERNT-BERGMEYER (3) nachgewiesen, der für unser Material etwas modifiziert wurde.

#### 1. Prinzip der Reaktion:

Die sogenannte LAP katalysiert in dem Versuchsansatz die



Freigesetztes  $\beta$ -Naphthylamin wird mit dem Diazoniumsalz Echtröt 3GL zu einem roten Farbstoff gekuppelt. Dieser Farbstoff wird mit Essigsäureäthylester ausgeschüttelt und colorimetriert. Die pro Zeiteinheit freigesetzte  $\beta$ -Naphthylamin-Menge ist ein Maß für die Enzymaktivität.

## 2. Notwendige Reagentien:

- a) Kaliumdihydrogenphosphat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck 4873)
- b) Dikaliumhydrogenphosphat  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Merck 5100)
- c) L-Leucyl- $\beta$ -naphthylamin-hydrochlorid  
(Dr. Th. Schuchardt, München)
- d) Echtrot 3GL (diazotiertes 3-Chlor-4-nitrilin)  
(Boehringer, Mannheim)
- e) Perchlorsäure, p.a., Dichte = 1,67; ca 70%
- f) Essigsäureäthylester
- g)  $\beta$ -Naphthylamin (Merck 6248)

## 3. Herstellung der Lösungen:

- I. Phosphatpuffer (0,05 M; pH = 7,2). 0,05 molare  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und 0,05 molare  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  wurden unter der Elektrode auf pH = 7,2 eingestellt.
- II. L-Leucyl- $\beta$ -Naphthylamin-hydrochlorid. 15 mg L-Leucyl- $\beta$ -Naphthylamin-hydrochlorid wurden mit 2,5 ml bidest. Wasser gelöst.
- III. LAP-Reagenz. Lösung II wurde unter kräftigem Rühren in 50 ml Phosphatpuffer gelöst.
- IV. Chromogen. Kurz vor einer Bestimmungsserie wurde 20 mg Echtrot 3GL in 20 ml bidest. Wasser gelöst.
- V.  $\beta$ -Naphthylamin-Lösung für die Eichkurve. 100 mg  $\beta$ -Naphthylamin wurde in einem 500 ml-Meßkolben mit 96% vergälltem Alkohol gelöst und bis zur Marke mit Alkohol aufgefüllt.
- VI. Perchlorsäure (ca. 0,6 M). 5 ml 70% Perchlorsäure wurde mit bidest. Wasser auf 100 ml verdünnt.

Das LAP-Reagenz (Lösung III) ist in dunkler Flasche bei 4° C mindestens 4 Wochen haltbar. Chromogen (Lösung IV) ist instabil und wurde kurz vor der Verwendung frisch hergestellt. Alle anderen Lösungen sind auch bei Raumtemperatur stabil.

## 4. Eichkurve:

Die  $\beta$ -Naphthylamin-Standardlösung (V) enthält 200/ml. Es wurden 0,05 ml und 0,10 ml, entsprechend 10<sub>8</sub> und 20<sub>8</sub>  $\beta$ -Naphthylamin,

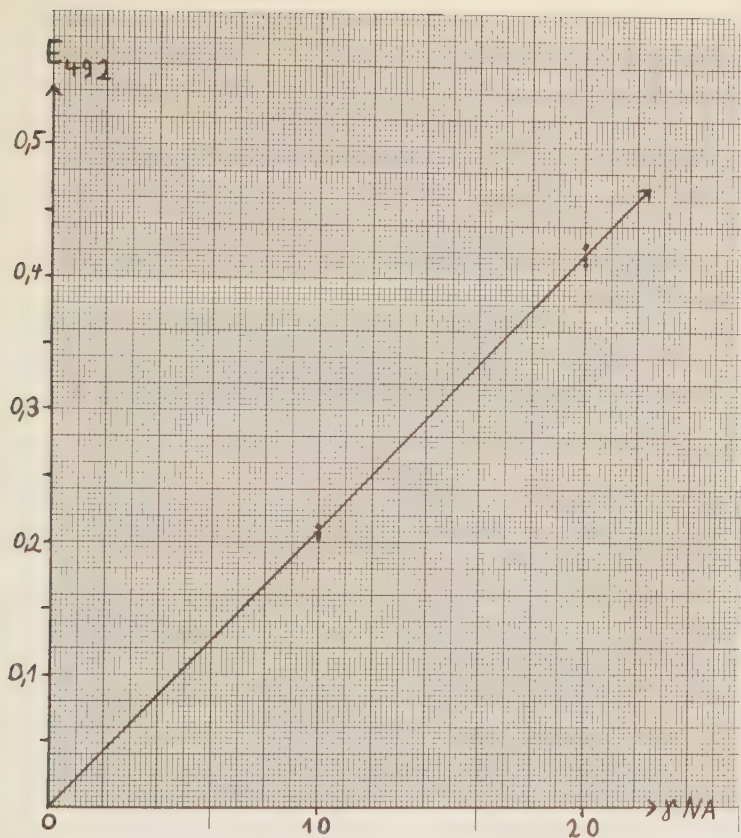


Abb. 1. zeigt die Eichkurve für  $\beta$ -Naphthylamin. Die eingesetzten  $x$   $\beta$ -NA wurden auf der Abszisse, die gefundenen Extinktionen auf der Ordinate aufgetragen.

| 10 $x$ $\beta$ -NA | 20 $x$ $\beta$ -NA |
|--------------------|--------------------|
| 0,204              | 0,424              |
| 0,202              | 0,416              |
| 0,201              | 0,412              |
| 0,211              | 0,425              |
| 0,204              | 0,419              |

Tab. 1. zeigt die gefundenen Extinktionen bei 492 nm und deren Mittelwert für 10 bzw 20  $x$   $\beta$ -Naphthylamin.

eingesetzt. Dazu einen Leerwert wie die Eichwerte, aber ohne  $\beta$ -Naphthylamin.

In ein 10ml-Zentrifugenglas wurden nacheinander pipettiert:

0,50 ml bidest. Wasser

0,05 bzw. 0,10 ml  $\beta$ -Naphthylaminstandardlösung (V)

0,50 ml Perchlorsäure (VI)

1,00 ml Chromogen-Lösung (IV)

wurden gemischt und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

5,00 ml Essigsäureäthylester

wurden zugegeben und, wie unter "Bestimmungsansatz" beschrieben, weiterverarbeitet. Die Extinktionen (Ordinate) wurden gegen  $\beta$ -Naphthylamin (Abszisse) aufgetragen. (Abb.1 auf S.7)

## 5. Arbeitsweise

### a) Bestimmungsansatz:

Testvolumen: 3,5 ml; Inkubationszeit: 37°C (im Wasserbad)

Meßstrahlung: 492m $\mu$ ; Schichtdicke 1 cm.

Zu jeder Versuchsreihe wurde ein Reagentienleerwert ohne Enzymlösung angesetzt, der wie der Hauptwert behandelt wurde. Die Messung erfolgte gegen diesen Leerwert.

In ein 10 ml-Zentrifugenglas wurde nacheinander pipettiert:

2,50 ml LAP-Reagenz (Lösung III)

1,00 ml der eluierten Fraktion

gemischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurden

2,50 ml Perchlorsäure (Lösung VI)

zugegeben, gemischt und 5 min bei ca. 3000 U/min zentrifugiert.

In je ein 10ml-Zentrifugenglas wurden pipettiert:

1,00 ml Überstand bzw. Leerwertlösung

1,00 ml Chromogen-Lösung (IV)

gemischt und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

5,00 ml Essigsäureäthylester

wurden zugegeben, 30 sec kräftig geschüttelt und bei 3000 U/min kurz zentrifugiert. Die überstehende, rot gefärbte Lösung wurde mit einer Pipette in eine trockene oder mit Alkohol ausgespülte Küvette gebracht und bei 492m $\mu$  gegen den Leerwert gemessen (Photometer Eppendorf). Für die gemessene Extinktion wurde die zugehörige Menge  $\beta$ -Naphthylamin aus der Eichkurve entnommen.

b) Berechnung der Aktivität:

Die Aktivität wurde in  $\gamma$ - $\beta$ -Naphthylamin/mg Prot/Std (37°C) wie folgt berechnet: Bei 1 ml der Probe in 3,5 ml Testvolumen (1 ml Probe + 2,50 ml LAP-Reagenz) und einer Verdünnung (durch Enteiweißung mit 2,50 ml Perchlorsäure) von 3,5 : 6 ist die aus der Eichkurve abgelesene Menge  $\beta$ -Naphthylamin mit  $3,5 \times 6/3,5 = 6$  (Testvolumen  $\times$  Verdünnung) zu multiplizieren. Somit ergibt sich unsere spezifische Aktivität als

$$\gamma \beta\text{-NA/mg Prot/Std}(37^\circ\text{C}) = \frac{\gamma \beta\text{-NA aus der Eichkurve}}{\text{mg Prot}} \times 6$$

c) Ansatz zur Hemmung und Aktivierung der LAP:

In einer Versuchsreihe wurde zu 0,3 ml Enzymlösung 0,3 ml 0,05 M MgCl oder 0,3 ml 0,1 M EDTA (Äthylendiamintetraacetat) zugegeben, bzw. zu 0,5 ml Enzymlösung 0,5 ml 0,005 M MnCl<sub>2</sub>. Die Aktivität wurde getestet und mit einem Ansatz, der nur Enzymlösung enthielt, verglichen.

E R G E B N I S S E

In allen untersuchten Anteilen des Ovariums ließ sich die L-Leucyl- $\beta$ -Naphthylamin-spaltende Enzymaktivität in 5 Fraktionen (Gipfel) zerlegen.

1. Versuchsprotokolle der untersuchten Gewebearten:

Die folgenden Tabellen zeigen repräsentativ je ein Protokoll einer Serie von Versuchen mit einer Gewebeart. Dabei gibt die erste Spalte den prozentualen Anteil der Aktivität des Gipfels, die zweite die fortlaufende Nummer der getesteten Fraktion an. Die dritte Spalte zeigt die mg Protein/ml, die vierte die gemessene Enzymaktivität und die fünfte Spalte gibt die spezifische Aktivität an. Zur besseren Anschaulichkeit der Ergebnisse werden die Versuchsprotokolle auch in Kurven wiedergegeben. Auf den Kurven gibt die durchgezogene Linie den Proteingehalt in mg/ml an. Die durchbrochene Linie zeigt die Extinktion bei 492 m $\mu$  an. Der Maßstab wurde so gewählt, daß alle Gipfel sich deutlich darstellten. Dabei ließ sich zum Teil ein "Abschneiden" des ersten Gipfels nicht vermeiden.

| Gipfel | lfd Nr. | mg Prot/ml | E <sub>492</sub> | spez. Aktiv. |
|--------|---------|------------|------------------|--------------|
| I.     | 1       | 2,64       |                  |              |
| mit    | 2       | 21,35      | 0,215            | 2,9          |
| 58%    | 3       | 1,31       | 0,018            | 4,0          |
| der    | 4       | 5,48       | 0,002            | 0,1          |
| GAkt.  | 5       | 3,91       |                  |              |
|        | 6       | 3,28       |                  |              |
|        | 7       | 2,85       |                  |              |
|        | 8       | 2,5        |                  |              |
|        | 9       | 2,3        |                  |              |
|        | 10      | 1,95       |                  |              |
|        | 11      | 0,92       |                  |              |
| II.    | 12      | 0,83       | 0,013            | 4,5          |
| mit    | 13      | 1,27       | 0,012            | 2,5          |
| 7%     | 14      | 1,08       | 0,006            | 1,6          |
| der    | 15      | 1,22       |                  |              |
| GAkt.  | 16      | 1,2        |                  |              |
|        | 17      | 1,1        |                  |              |
|        | 18      | 0,72       |                  |              |
| III.   | 19      | 1,02       | 0,004            | 1,2          |
| mit    | 20      | 0,72       | 0,015            | 6,0          |
| 6%     | 21      | 0,38       | 0,005            | 3,8          |
|        | 22      | 0,20       |                  |              |
|        | 23      | 0,184      |                  |              |
|        | 24      | 0,2        |                  |              |
|        | 25      | 0,2        |                  |              |
|        | 26      | 0,2        |                  |              |
| IV.    | 27      | 0,29       | 0,002            | 2,0          |
| mit    | 28      | 0,28       | 0,003            | 3,1          |
| 25%    | 29      | 0,41       | 0,026            | 18,3         |
|        | 30      | 0,39       | 0,020            | 14,8         |
|        | 31      | 0,31       | 0,016            | 15,0         |
|        | 32      | 0,21       | 0,014            | 19,2         |
|        | 33      | 0,18       | 0,013            | 21,0         |
|        | 34      | 0,16       | 0,004            | 7,2          |
|        | 35      | 0,15       | 0,002            | 3,9          |
| V.     | 36      | 0,17       | 0,005            | 8,5          |
| mit    | 37      | 0,29       | 0,006            | 6,0          |
| 4%     | 38      | 0,27       | 0,004            | 4,3          |
|        | 39      | 0,26       |                  |              |
|        | 40      | 0,23       |                  |              |

Tab. 2. zeigt die Verteilung der sogenannten LAP-Aktivität im Liquor folliculi kleiner Tertiärfollikel. Die Gesamtaktivität verteilt sich mit 58%, 7%, 6%, 25% und 4% auf die Gipfel I bis V.

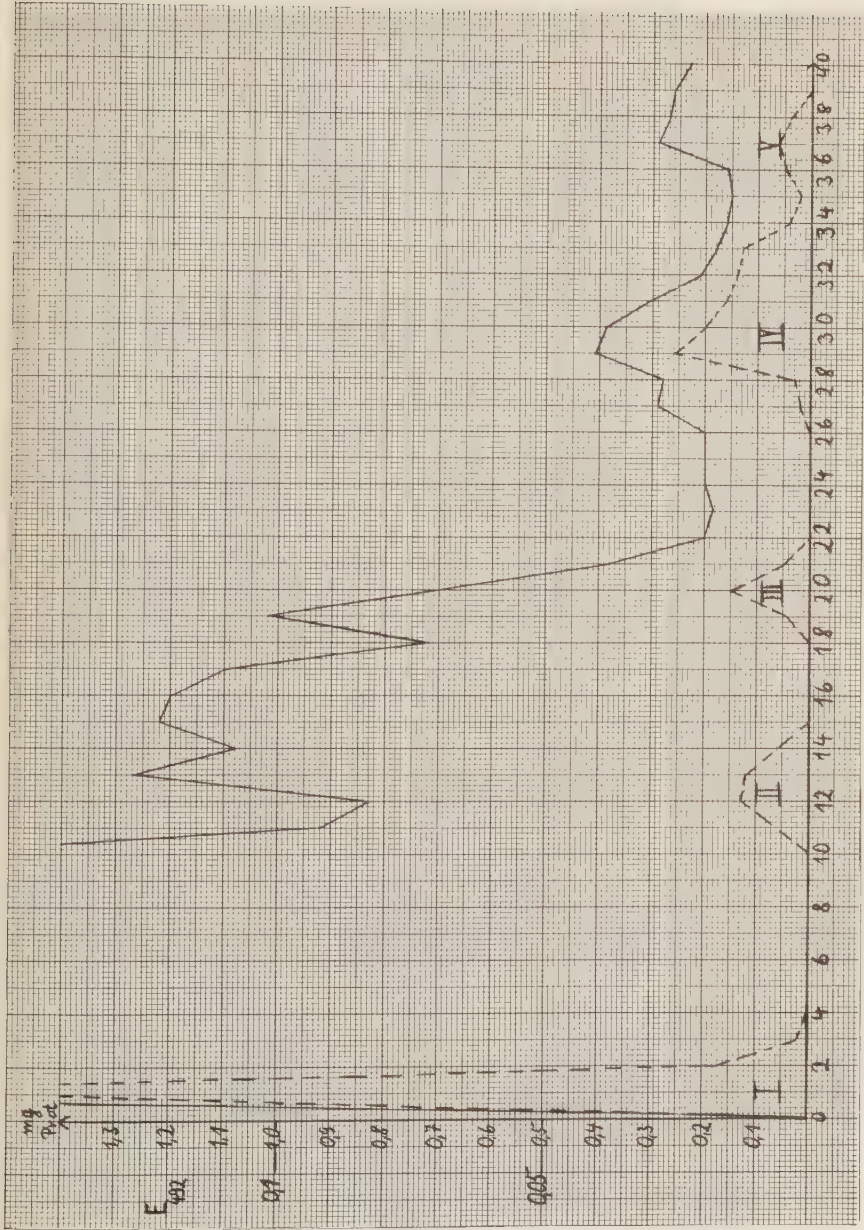


Abb. 2 zeigt für den Liquor folliculi kleiner Tertiärfollikel die Verteilung der sogenannten LAP-Aktivität. (Proteingehalt —, gemessene Extinction - -)

| Gipfel | lfd Nr. | mg Prot/ml | E <sub>492</sub> | spez. Aktiv. |
|--------|---------|------------|------------------|--------------|
| I.     | 1       | 4,16       |                  |              |
| mit    | 2       | 28,10      | 0,170            | 1,7          |
|        | 3       | 1,80       | 0,007            | 1,1          |
| 50%    | 4       | 0,70       |                  |              |
| der    | 5       | 0,51       |                  |              |
|        | 6       | 0,49       |                  |              |
| Ges.   | 7       | 0,43       |                  |              |
| Akt.   | 8       | 0,32       |                  |              |
|        | 9       | 0,43       |                  |              |
|        | 10      | 0,41       |                  |              |
| II.    | 11      | 0,42       |                  |              |
| mit    | 12      | 0,76       | 0,003            | 1,1          |
|        | 13      | 0,88       | 0,005            | 1,6          |
| 2%     | 14      | 0,50       |                  |              |
| der    | 15      | 0,42       |                  |              |
|        | 16      | 0,36       |                  |              |
| Ges.   | 17      | 0,35       |                  |              |
| Akt.   | 18      | 0,34       |                  |              |
| III.   | 19      | 0,36       | 0,004            | 3,2          |
| mit    | 20      | 0,67       | 0,028            | 12,1         |
|        | 21      | 0,44       | 0,011            | 7,2          |
| 14%    | 22      | 0,35       | 0,005            | 4,1          |
|        | 23      | 0,30       |                  |              |
|        | 24      | 0,33       |                  |              |
|        | 25      | 0,33       |                  |              |
| IV.    | 26      | 0,39       | 0,006            | 4,5          |
| mit    | 27      | 0,54       | 0,029            | 15,5         |
|        | 28      | 0,50       | 0,024            | 14,0         |
| 29%    | 29      | 0,37       | 0,013            | 10,2         |
|        | 30      | 0,27       | 0,009            | 9,6          |
|        | 31      | 0,21       | 0,008            | 11,0         |
|        | 32      | 0,18       | 0,006            | 9,6          |
|        | 33      | 0,17       | 0,005            | 8,5          |
|        | 34      | 0,16       | 0,003            | 5,4          |
| V.     | 35      | 0,20       | 0,007            | 10,1         |
| mit    | 36      | 0,34       | 0,005            | 4,2          |
|        | 37      | 0,32       | 0,003            | 2,7          |
| 5%     | 38      | 0,20       | 0,002            | 2,9          |
|        | 39      | 0,13       |                  |              |

Tab. 3. zeigt die Verteilung der sogenannten LAP-Aktivität im Liquor folliculi großer, sprungreifer Follikel. Die Gesamtaktivität verteilt sich mit 50%, 2%, 14%, 29% und 5% auf die Gipfel I bis V.

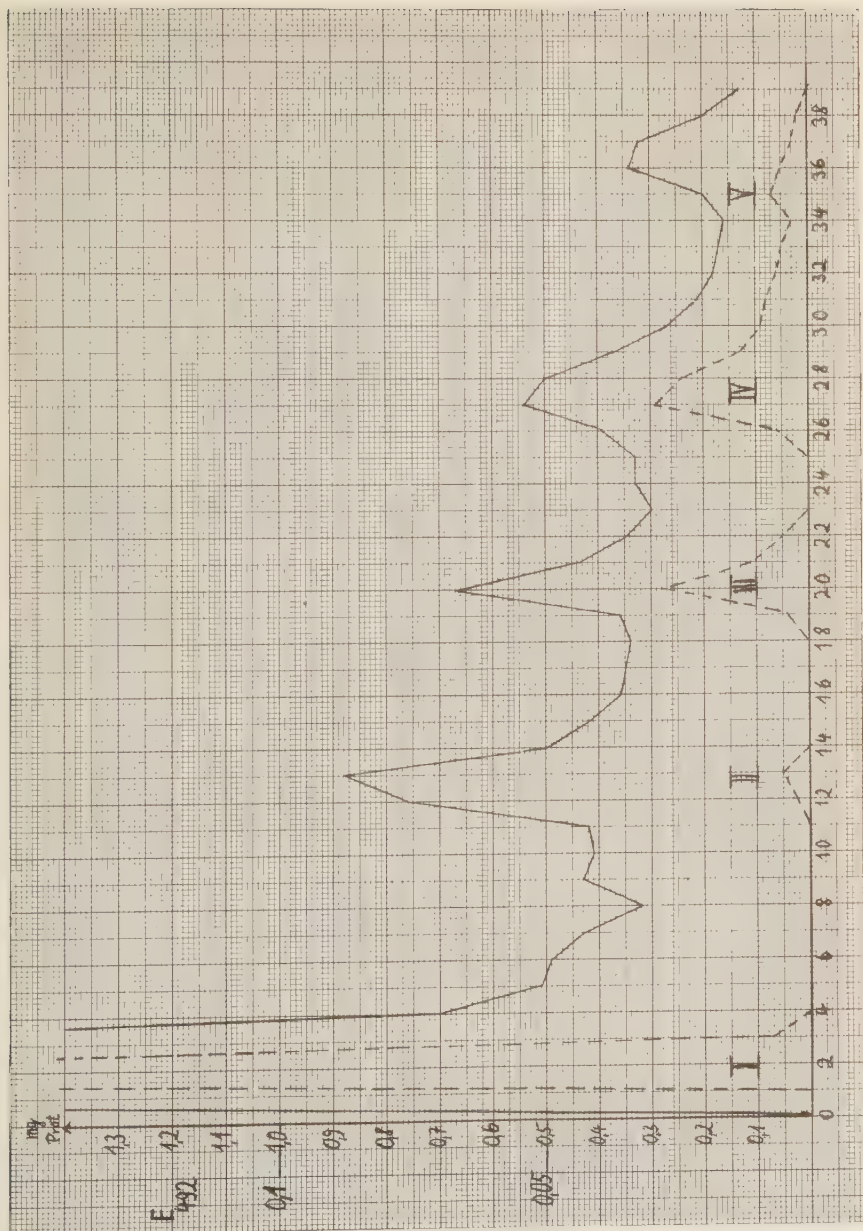


Abb. 3 zeigt für den Liquor folliculi großer, sprungreifer Follikel die Verteilung der sog. LAP-Aktivität. (Proteingehalt —, gemessene Extinktion - -)

| Gipfel | lfd Nr. | mg Prot/ml | N <sub>492</sub> | spez. Aktiv. |
|--------|---------|------------|------------------|--------------|
| I.     | 1       | 6,15       | 0,045            | 2,1          |
| mit    | 2       | 15,20      | 0,120            | 2,5          |
| 30%    | 3       | 1,86       | 0,022            | 3,4          |
| der    | 4       | 0,56       | 0,002            | 1,0          |
|        | 5       | 0,24       |                  |              |
| Ges.   | 6       | 0,13       |                  |              |
|        | 7       | 0,08       |                  |              |
| Akt.   | 8       | 0,06       |                  |              |
|        | 9       | 0,05       |                  |              |
|        | 10      | 0,05       |                  |              |
| II.    | 11      | 0,05       |                  |              |
| mit    | 12      | 0,09       | 0,004            | 12,9         |
| 2%     | 13      | 0,09       | 0,010            | 32,2         |
|        | 14      | 0,08       |                  |              |
|        | 15      | 0,04       |                  |              |
|        | 16      | 0,07       |                  |              |
|        | 17      | 0,03       |                  |              |
|        | 18      | 0,02       |                  |              |
| III.   | 19      | 0,04       |                  |              |
| mit    | 20      | 0,06       | 0,004            | 19,4         |
| 1%     | 21      | 0,07       |                  |              |
|        | 22      | 0,06       |                  |              |
|        | 23      | 0,06       |                  |              |
|        | 25      | 0,05       |                  |              |
|        | 26      | 0,05       |                  |              |
| IV.    | 27      | 0,05       | 0,006            | 34,8         |
| mit    | 28      | 0,23       | 0,089            | 112          |
| 51%    | 29      | 0,10       | 0,042            | 122          |
|        | 30      | 0,05       | 0,052            | 302          |
|        | 31      | 0,05       | 0,025            | 145          |
|        | 32      | 0,03       | 0,026            | 251          |
|        | 33      | 0,03       | 0,022            | 212          |
|        | 34      | 0,02       | 0,017            | 246          |
|        | 35      | 0,01       | 0,013            | 188          |
|        | 36      | 0,03       | 0,009            | 87           |
|        | 37      | 0,02       | 0,005            | 72           |
| V.     | 38      | 0,02       | 0,006            | 87           |
| mit    | 39      | 0,13       | 0,031            | 69           |
| 16%    | 40      | 0,16       | 0,040            | 72           |
|        | 41      | 0,06       | 0,010            | 48           |
|        | 42      | 0,05       | 0,005            | 29           |
|        | 43      | 0,03       |                  |              |

Tab. 4. zeigt die Verteilung der sogenannten LAP-Aktivität in den Corpora rubra. Die Gesamtaktivität verteilt sich mit 30%, 2%, 1%, 51%, und 16% auf die Gipfel I bis V.

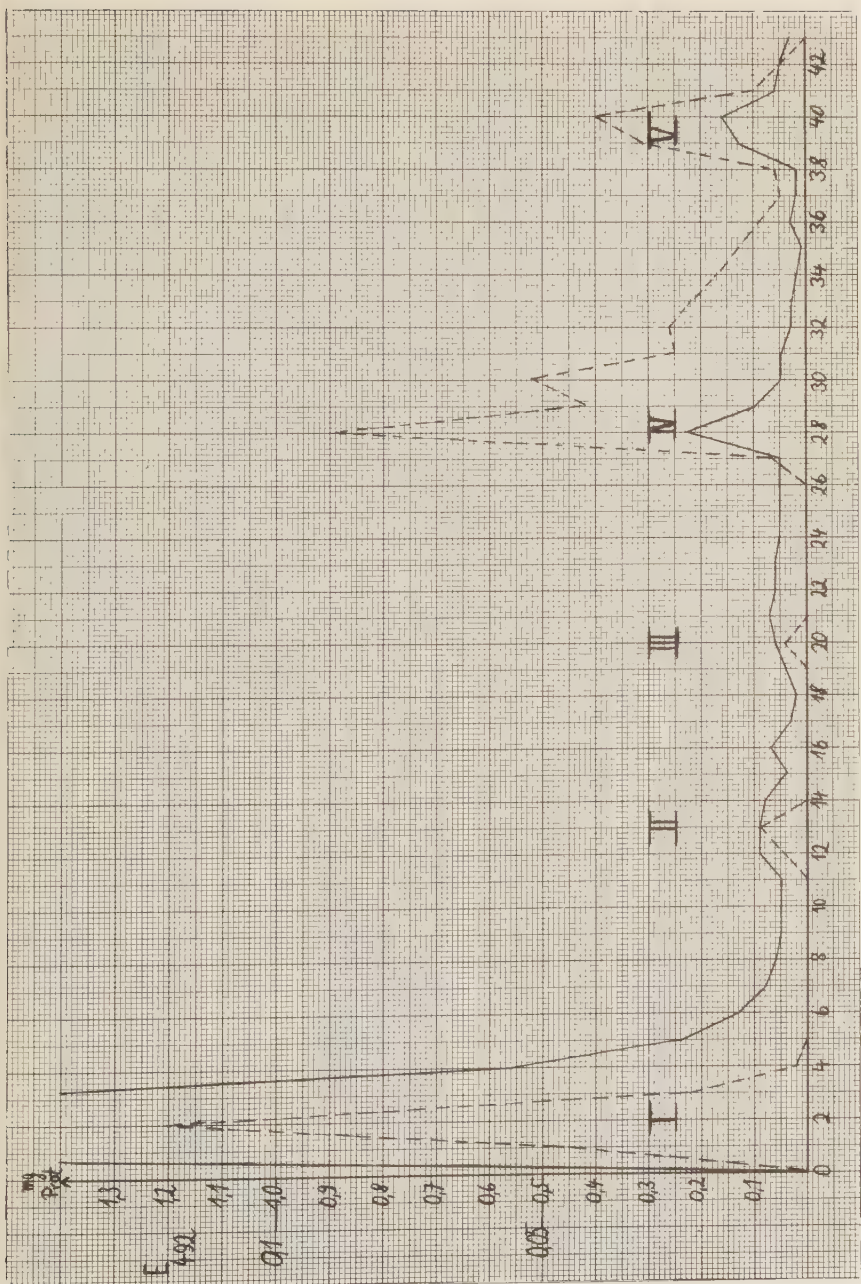


Abb. 4 zeigt die Verteilung der sog. IAP-Aktivität in den Corpora rubra.  
( Proteingehalt —, gemessene Extinktion - - - )

| Gipfel                                  | lfd Nr. | mg Prot/ml | E <sub>492</sub> | spez. Aktiv. |
|-----------------------------------------|---------|------------|------------------|--------------|
| I.<br>mit<br>28%<br>der<br>Ges.<br>Akt. | 1       | 1,43       | 0,136            | 28           |
|                                         | 2       | 2,53       | 0,870            | 99           |
|                                         | 3       | 0,7        | 0,300            | 124          |
|                                         | 4       | 2,4        | 0,120            | 14,5         |
|                                         | 5       | 2,1        | 0,035            | 4,8          |
|                                         | 6       | 2,56       | 0,020            | 2,3          |
|                                         | 7       | 0,83       | 0,010            | 3,6          |
|                                         | 8       | 0,32       | 0,005            | 4,5          |
|                                         | 9       | 0,13       |                  |              |
|                                         | 10      | 0,07       |                  |              |
|                                         | 11      | 0,05       |                  |              |
| II.<br>mit<br>1%                        | 12      | 0,05       | 0,005            | 29           |
|                                         | 13      | 0,1        | 0,035            | 103          |
|                                         | 14      | 0,09       | 0,020            | 64           |
|                                         | 15      | 0,06       | 0,015            | 72           |
|                                         | 16      | 0,04       | 0,009            | 65           |
|                                         | 17      | 0,02       | 0,004            | 58           |
|                                         | 18      | 0,02       |                  |              |
|                                         | 19      | 0,02       |                  |              |
| III.<br>mit<br>2%                       | 20      | 0,07       | 0,030            | 124          |
|                                         | 21      | 0,15       | 0,032            | 62           |
|                                         | 22      | 0,14       | 0,020            | 41           |
|                                         | 23      | 0,10       | 0,010            | 29           |
|                                         | 24      | 0,07       |                  |              |
|                                         | 25      | 0,05       |                  |              |
|                                         | 26      | 0,04       |                  |              |
|                                         | 27      | 0,04       |                  |              |
|                                         | 28      | 0,03       |                  |              |
| IV.<br>mit<br>57%                       | 29      | 0,09       | 0,090            | 290          |
|                                         | 30      | 0,24       | 0,790            | 950          |
|                                         | 31      | 0,22       | 0,790            | 1080         |
|                                         | 32      | 0,16       | 0,400            | 720          |
|                                         | 33      | 0,08       | 0,300            | 1090         |
|                                         | 34      | 0,04       | 0,235            | 1700         |
|                                         | 35      | 0,03       | 0,190            | 1840         |
|                                         | 36      | 0,02       | 0,150            | 2180         |
|                                         | 37      | 0,01       | 0,130            | 3800         |
| V.<br>mit<br>12%                        | 38      | 0,25       | 0,195            | 226          |
|                                         | 39      | 0,25       | 0,215            | 250          |
|                                         | 40      | 0,40       | 0,120            | 87           |
|                                         | 41      | 0,15       | 0,045            | 87           |
|                                         | 42      | 0,06       | 0,030            | 14,5         |
|                                         | 43      | 0,03       | 0,015            | 14,5         |
|                                         | 44      | 0,01       | 0,005            | 14,5         |

Tab. 5. zeigt die Verteilung der sogenannten LAP-Aktivität in den Corpora lutea. Die Gesamtaktivität verteilt sich mit 28%, 1%, 2%, 57% und 12% auf die Gipfel I bis V.

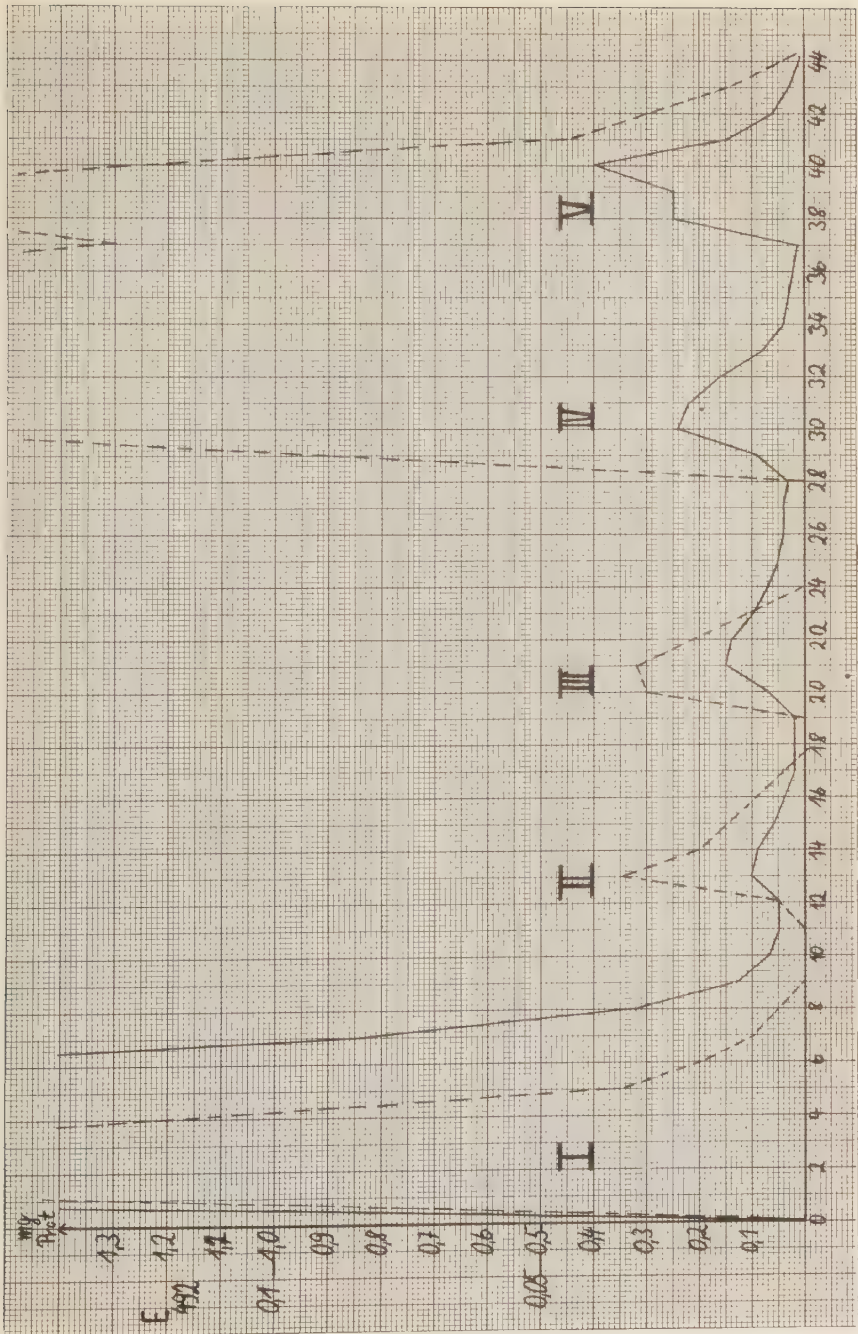


Abb. 5 zeigt die Verteilung der sog. LAP-Aktivität in den Corpora lutea.  
( Proteingehalt — , Gemessene Extinktion - - - )

| Gipfel | lfd Nr. | mg Prot/ml | E <sub>492</sub> | spez. Aktiv. |
|--------|---------|------------|------------------|--------------|
| I.     | 1       | 0,26       | 0,015            | 16,7         |
| mit    | 2       | 0,76       | 0,147            | 56           |
| 34%    | 3       | 0,52       | 0,045            | 25,1         |
|        | 4       | 0,14       | 0,015            | 31           |
| der    | 5       | 0,07       | 0,009            | 37           |
|        | 6       | 0,04       |                  |              |
| Ges.   | 7       | 0,01       |                  |              |
| Akt.   | 8       | 0,01       |                  |              |
|        | 9       | 0,01       |                  |              |
|        | 10      | 0,01       |                  |              |
| II.    | 11      | 0,01       | 0,004            | 116          |
| mit    | 12      | 0,06       | 0,015            | 72           |
| 8%     | 13      | 0,15       | 0,028            | 54           |
|        | 14      | 0,08       | 0,004            | 14,5         |
|        | 15      | 0,04       |                  |              |
|        | 16      | 0,03       |                  |              |
|        | 17      | 0,02       |                  |              |
|        | 18      | 0,02       |                  |              |
|        | 19      | 0,01       |                  |              |
| III.   | 20      | 0,43       | 0,044            | 30           |
| mit    | 21      | 0,48       | 0,134            | 81           |
| 29%    | 22      | 0,09       | 0,020            | 64           |
|        | 23      | 0,03       |                  |              |
|        | 24      | 0,01       |                  |              |
|        | 25      | 0,02       |                  |              |
|        | 26      | 0,04       |                  |              |
|        | 27      | 0,01       |                  |              |
|        | 28      | 0,01       |                  |              |
| IV.    | 29      | 0,01       |                  |              |
| mit    | 30      | 0,23       | 0,170            | 214          |
| 28%    | 31      | 0,09       | 0,018            | 58           |
|        | 32      | 0,01       |                  |              |
|        | 33      | 0,01       |                  |              |
|        | 34      | 0,01       |                  |              |
|        | 35      | 0,01       |                  |              |
| V.     | 36      | 0,01       |                  |              |
| mit    | 37      | 0,10       | 0,010            | 29           |
| 1%     | 38      | 0,18       |                  |              |
|        | 39      | 0,04       |                  |              |
|        | 40      | 0,01       |                  |              |

Tab. 6. zeigt die Verteilung der sogenannten LAP-Aktivität in den Corpora albicantia. Die Gesamtaktivität verteilt sich mit 34%, 8%, 29%, 28% und 1% auf die Gipfel I bis V.

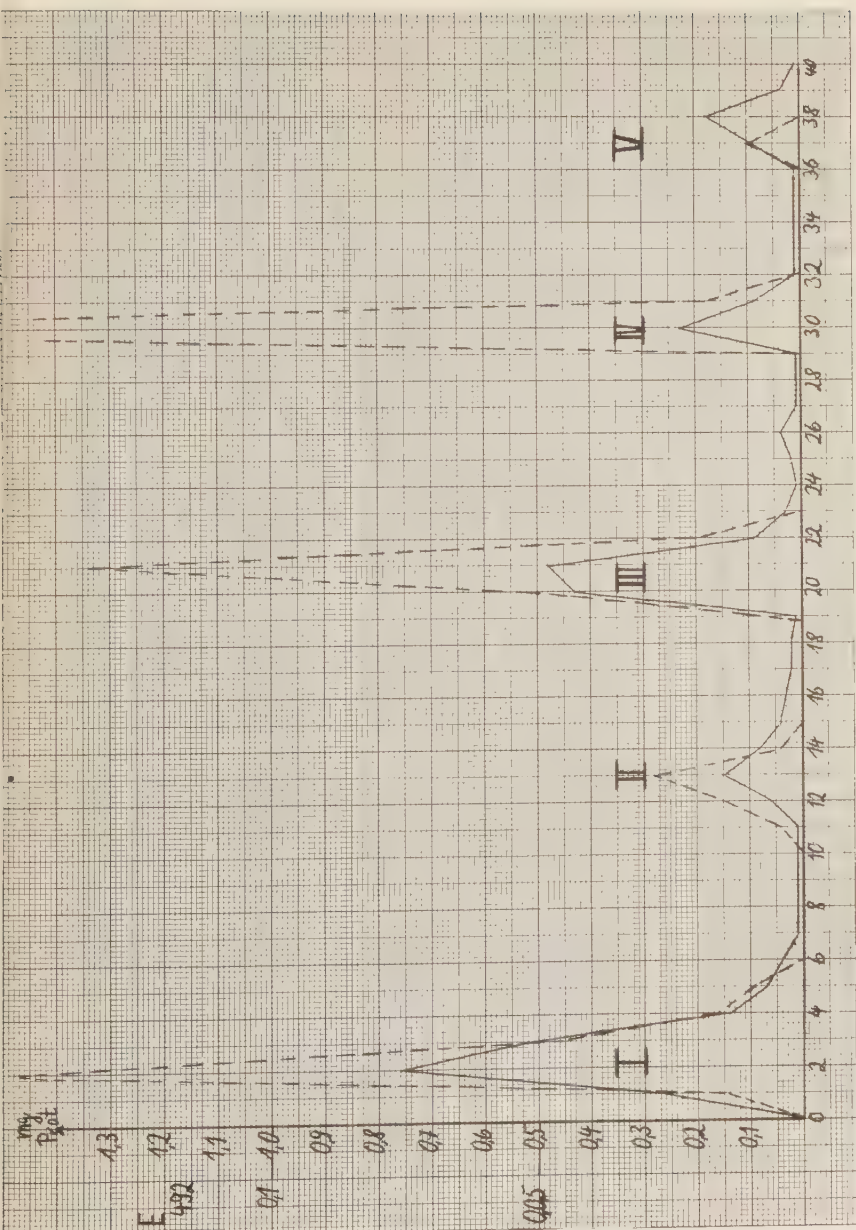


Abb. 6 zeigt die Verteilung der sog. LAP-Aktivität in den *Corpora albicantia*.  
( Proteingehalt — , gemessene Extinktion - - - )

## 2. Die prozentuale Verteilung der Aktivität.

Die prozentuale Verteilung der Aktivität auf die einzelnen Gipfel für die verschiedenen Anteile des Ovars ist in Tabelle 7. wiedergegeben. Eine graphische Darstellung zeigt Abbildung 7. Zur Berechnung wurde die Gesamtheit der Aktivität in allen eluierten Fraktionen gleich 100 gesetzt und die prozentuale Verteilung auf die 5 Gipfel ermittelt. Zu einem Gipfel wurden jeweils die bei einer Konzentration des Elutionsmittels entwickelten Fraktionen zusammengefaßt.

| Gewebeart mit<br>Zahl der Vers.      | Gipfel<br>I. | Gipfel<br>II. | Gipfel<br>III. | Gipfel<br>IV. | Gipfel<br>V. |
|--------------------------------------|--------------|---------------|----------------|---------------|--------------|
| kleine Ter-<br>tiärfollikel<br>( 2 ) | 58%          | 7%            | 6%             | 25%           | 4%           |
| große<br>Follikel<br>( 3 )           | 52%          | 1%            | 19%            | 26%           | 2%           |
| Corpora<br>rubra<br>( 2 )            | 34%          | 2%            | 1%             | 47%           | 16%          |
| Corpora<br>lutea<br>( 3 )            | 26%          | 1%            | 2%             | 60%           | 11%          |
| Corpora<br>albicantia<br>( 2 )       | 65%          | 12%           | 12%            | 10%           | 1%           |

Tab. 7. zeigt die prozentuale Verteilung der Aktivität auf die einzelnen Gipfel. Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte.

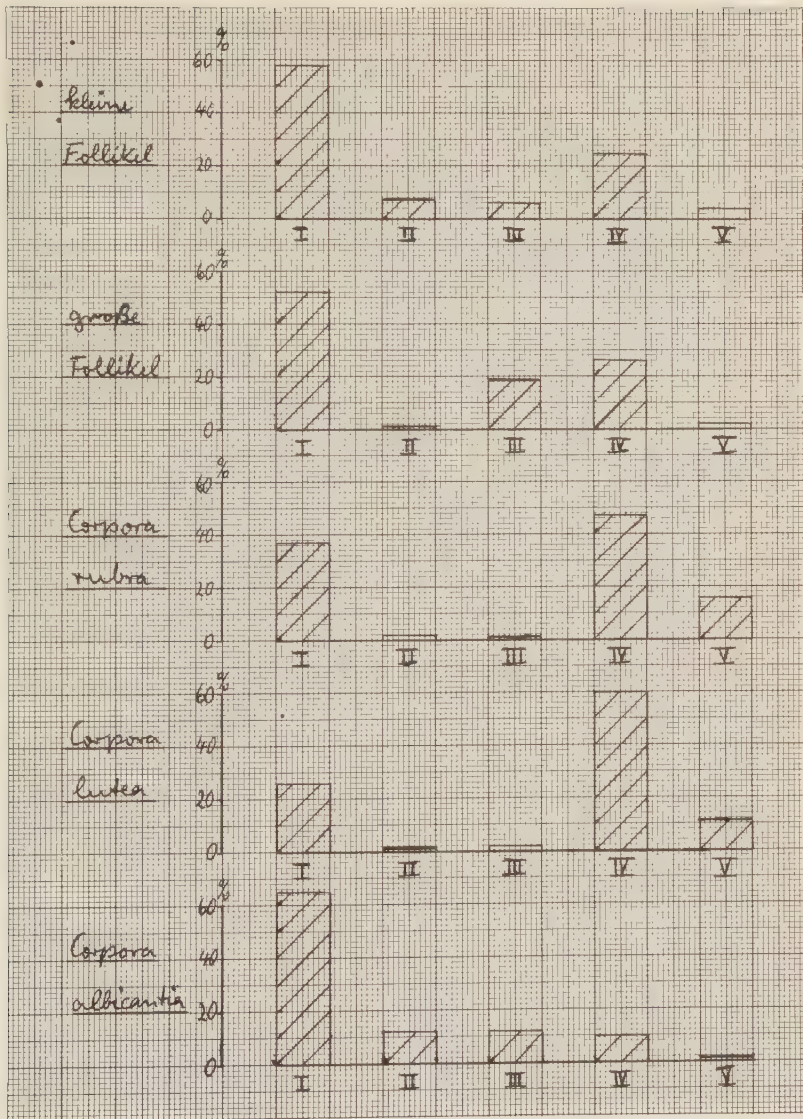


Abb. 7. zeigt die prozentuale Verteilung der Enzym-Aktivität auf die Gipfel I bis V.

### 3. Die Verteilung der spezifischen Aktivität.

Die Verteilung der spezifischen Aktivität in den einzelnen Gipfeln für die verschiedenen Anteile des Ovars ist in Tabelle 8. wiedergegeben. Eine graphische Darstellung zeigt die Abbildung 8. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wurden Aktivität und Proteingehalt der einzelnen Fraktionen je eines Gipfels addiert und zueinander in Beziehung gesetzt.

| Gewebeart              | Gipfel<br>I | Gipfel<br>II | Gipfel<br>III | Gipfel<br>IV | Gipfel<br>V |
|------------------------|-------------|--------------|---------------|--------------|-------------|
| kleine Tertiärfollikel | 1,4         | 3,5          | 39            | 12,2         | 6,0         |
| große Follikel         | 0,73        | 1,97         | 4,1           | 10,0         | 3,5         |
| Corpora rubra          | 2,2         | 10,1         | 3,0           | 106          | 89          |
| Corpora lutea          | 224         | 44           | 57            | 940          | 256         |
| Corpora albicantia     | 173         | 41           | 38            | 110          | 26          |

Tab. 8. zeigt die Verteilung der spezifischen Aktivität des Enzyms auf die Gipfel I bis V. Die Aktivitätsangaben sind in  $\gamma$   $\beta$ -Naphthylamin/mg Prot/Std (37°C).

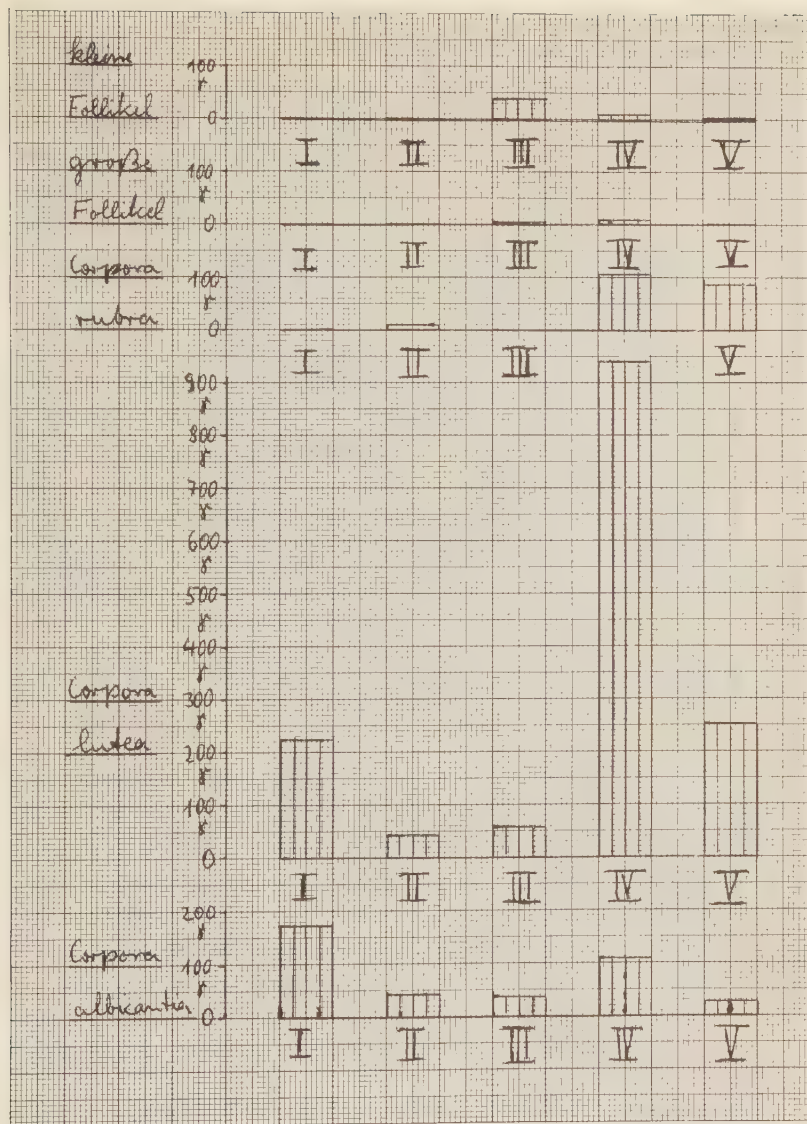


Abb. 8. zeigt die Verteilung der spezifischen Aktivität des Enzyms auf die Gipfel I bis V. Die Aktivitätsangaben sind in  $\gamma\beta$ -Naphthylamin/mg Prot/Std (37°C).

#### 4. Hemmung und Aktivierung der LAP

Da die LAP durch  $Mn^{++}$  oder  $Mg^{++}$  Ionen aktiviert wird (16,38) und diese Aktivierung durch EDTA (Äthylendiamintetraacetat) unterbunden werden soll (16), haben wir in Versuchsansätzen mit Zusätzen von  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$  und EDTA unsere Enzymlösungen getestet. Es fand sich dabei weder eine Aktivierung durch  $Mg^{++}$  oder  $Mn^{++}$  Ionen noch eine Hemmung durch EDTA.

| Ausgangswert | mit $MgCl$ | mit EDTA |
|--------------|------------|----------|
| <b>1,260</b> | 1,253      | 1,209    |
| 0,432        | 0,484      | 0,403    |
| 0,007        | 0,009      | 0,008    |
| 0,113        | 0,141      | 0,022    |

Tab. 9 zeigt Aktivierung durch  $Mg^{++}$  bzw. Hemmung durch EDTA.

| Ausgangswert | mit $MnCl$ |
|--------------|------------|
| 0,074        | 0,102      |
| 0,183        | 0,185      |
| 0,009        | 0,005      |
| 0,036        | 0,035      |

Tab. 10. zeigt die Aktivierung durch  $Mn^{++}$  Ionen.

## DISKUSSION

Die im Liquor folliculi enthaltenen Eiweißkörper, sowie die im Überstand des Homogenates von Corpora lutea, rubra und albican-tia löslichen Proteine ließen sich durch die Stufenelution säu-lenchromatographisch in 5 Anteile auftrennen, die jeweils ei-ner Konzentration des Elutionsmittels zuzuordnen sind und die wir als Gipfel I bis V bezeichnet haben. In jedem dieser Gip-fel ließ sich sogenannte LAP-Aktivität nachweisen.

Die prozentuale Verteilung dieser Aktivität auf die einzelnen Gipfel ist beim Liquor folliculi junger und reifer Follikel am größten in Gipfel I und IV. Zwischen jungen Tertiärfollikeln und reifen Follikeln besteht kein nennenswerter Unterschied. Im Corpus luteum findet sich der größte Anteil der Aktivität in Gipfel IV mit 60%. Trotz der geringen Anzahl unserer Versu-che scheint sich doch ein Unterschied der prozentualen Vertei-lung in Liquor folliculi mit rund 50% in Gipfel I und rund 25% in Gipfel IV gegenüber den Corpora lutea mit rund 26% in Gip-fel I und 60% in Gipfel IV anzudeuten. Die Werte für das Corpus rubrum mit 34% in Gipfel I und 47% in Gipfel IV liegen etwa dazwischen.

Die spezifische Aktivität ist in den jungen Tertiärfollikeln in jedem Gipfel größer als in reifen Follikeln, insbesondere in dem Gipfel III mit 39  $\mu\beta$ -NA/mg Prot/Std (37°C) bei den jungen Tertiärfollikeln, gegenüber 4,1  $\mu\beta$ -NA/mg Prot/Std bei den reifen Follikeln. Am höchsten ist die spezifische Aktivi-tät im Corpus rubrum mit 224  $\mu\beta$ -NA/mg Prot/Std (37°C) in Gi-fel I, 44  $\mu\beta$ -NA/mg Prot/Std (37°C) in Gipfel II, mit 57  $\mu\beta$ -NA in Gipfel III, mit 940  $\mu\beta$ -NA/mg Prot/Std (37°C) in Gipfel IV und mit 256  $\mu\beta$ -NA/mg Prot/Std (37°C) in Gipfel V.

Die in den jungen Tertiärfollikeln, gegenüber den reifen Fol-likeln, höhere spezifische Aktivität steht im Einklang mit den Ergebnissen von JUNG (14). Im Liquor folliculi junger Ter-tiärfollikel findet sich die Aktivität zahlreicher Enzyme

größer als in den großen, sprungreifen Follikeln. Dieser Befund wurde mit dem Austritt und der nachfolgenden Inaktivierung von Enzymen aus den Zellen, die sich bei der Bildung der Follikelhöhle auflösen, erklärt (36). Auch SCHWÄGERLE (30) fand wie wir die spezifische Aktivität am höchsten im Corpus luteum.

In der Mehrzahl bei den in der Literatur bekannten Arbeiten wurde zur Untersuchung der LAP-Aktivität L-Leucyl- $\beta$ -Naphthylamin (LEUNA) als Substrat verwandt. Auch von SCHWÄGERLE (30) und in der vorliegenden Arbeit wurde diese Verbindung benutzt. Zwar ist die LAP ein Enzym von verhältnismäßig geringer Spezifität (31), und so gibt z.B. BERGMAYER (3) folgende Substrate an: L-Leucyl-glycyl-glycin, L-Leucyl-glycin, L-Leucin-L-Leucin, Leucinamid, L-Leucyl- $\beta$ -Naphthylamin-Hydrochlorid. Doch wurde auf Grund verschiedener Eigenschaften hochgereinigter Aminopeptidasen angenommen, daß die Hydrolyse von L-Leucyl- $\beta$ -Naphthylamin (LEUNA) nur durch die LAP erfolgt (10,20).

Durch Beobachtung von Unterschieden der Substratspezifität, der Reaktionskinetik, dem Effekt von Hemmkörpern und Metallionen wurde diese Annahme jedoch bald in Frage gestellt (7). Inzwischen ist durch eine Reihe von Versuchen darauf hingewiesen worden, daß die Spaltung von LEUNA nicht spezifisch für die LAP ist, sondern durch mehrere Enzyme bewirkt werden kann (1,2,7,12,17,21,22,23,24,28,39). Die von vielen Autoren beobachtete Heterogenität der LAP-Aktivität im Serum ist ebenfalls ein Hinweis darauf, daß es sich hierbei um mehrere Enzyme handelt (17,28). NAGEL, WILLIG u. SCHMIDT (21) unterscheiden in normalen und pathologischen Seren die LEUNA-Spaltung deutlich von der Hydrolyse von LEU-NH<sub>2</sub>, dem Substrat der "klassischen LAP" von SPACKMAN u. SMITH (35). DIENSTL (5) verlangt deshalb, daß es nicht zulässig sei, die Spaltung von LEUNA einer LAP-Aktivität gleichzusetzen oder gar als solche zu bezeichnen.

Wir haben daher die von uns an Hand der Spaltung von LEUNA gefundene Aktivität in den Anteilen des Ovariums als "sogenannte LAP-Aktivität" bezeichnet. Gegen die Annahme, daß es sich um ein einheitliches Enzym handelt, spricht unser Befund der Auftrennbarkeit der sogenannten LAP-Aktivität in 5 Fraktionen in allen untersuchten Anteilen des Ovariums.

Gegen eine Einheitlichkeit des Enzyms, auch innerhalb der einzelnen, durch Säulenchromatographie gefundenen Fraktionen, spricht unser Befund bei den Hemmungs- und Aktivierungsversuchen. Hier ließ sich mit  $Mn^{++}$  und  $Mg^{++}$ -Ionen keine Aktivierung erzielen. Das von SPACKMAN u. SMITH (35) oder von KLEINE und HANSON (16) gefundene Enzym läßt sich durch diese Ionen aktivieren. Umgekehrt läßt sich auch keine Hemmung durch "Wegfangen" eventuell vorhandener  $Mn^{++}$  oder  $Mg^{++}$  Ionen aus der Versuchslösung mittels EDTA erreichen. KLEINE und HANSON fanden, daß die Aktivierung von LAP durch  $Mn^{++}$  Ionen durch Zugabe von EDTA ausbleibt.

In welchen unserer durch Säulenchromatographie eluierten Fraktionen sich die "klassische LAP" verbirgt, kann durch die vorliegende Untersuchung nicht abgeklärt werden. Die hohe spezifische Aktivität, die sich im Corpus luteum, und hier besonders in der Fraktion IV, nachweisen läßt, deutet auf eine besondere Bedeutung der sogenannten LAP in diesem Organ hin.

## ZUSAMMENFASSUNG

Ausgehend von den Untersuchungen von JUNG über die LAP im Ovarium werden an Hand der Literatur die biochemischen Eigenschaften und die klinische Bedeutung dieses Enzyms kurz umrissen.

Danach werden zusammenfassend die aus der Literatur bekannten Befunde über die Heterogenität der LAP-Aktivität skizziert.

In den eigenen Untersuchungen wurde im Liquor folliculi junger Tertiärfollikel und sprungreifer Follikel, Corpora rubra, Corpora lutea und Corpora albicantia von Schweineovarien die sogenannte LAP-Aktivität säulenchromatographisch an DEAE-Sephadex in 5 Fraktionen aufgetrennt.

In allen untersuchten Anteilen des Ovariums war die prozentuale Verteilung der Aktivität ähnlich.

Die spezifische Aktivität fand sich in der Fraktion IV des Corpus luteum um ein Mehrfaches höher als in den anderen Fraktionen.

$Mn^{++}$  und  $Mg^{++}$ -Ionen bewirken keine Aktivierung des Enzyms.

Daraus und aus den Ergebnissen anderer Autoren, denen unsere zur Seite gestellt werden, wird geschlossen, daß es sich bei den 5 verschiedenen Fraktionen um eine Reihe von Enzymen handelt, denen sämtlich die Fähigkeit LEUNA zu hydrolysieren zu eigen ist.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Behal, F.J., C.B. Kanavage and R.D. Hamilton: Separation of Leucylaminopeptidase Components in Normal Human Sera by DEAE-Cellulose Column Chromatography. Proc.Soc.exp. Biol.(N.Y.) 109, 411-412 (1962)
2. Behal, F.J., R.D. Hamilton, C.B. Kanavage, and E.C. Kelly: Studies on Amino-peptidase in Human Blood. Arch.Biochem. 100, 308-312 (1963)
3. Bermeyer, H.U.: Methoden der Enzymatischen Analyse. 833, (1962)
4. Concustell-Bas E., y V. Villar-Palasi: Localización de enzimas en las fracciones proteínas de la sangre. Rev.esp. Fisiol. 18, 151-155 (1962)
5. Dienstl, F., S. Sailer, F. Sandhofer und H. Braunsteiner: Spaltung von L-Leucyl- $\beta$ -Naphthylamid-HCl durch Leukocyten. Klin.W.Schr. 42, 794-797 (1964)
6. Dubbs, C.A.: Sub-Fractionation of Human Serum Leucine-Amino-peptidase. Nature 191, 1203 (1961)
7. Glenner, G.G., M.S. Burnstone and D.B. Meyer: A study of amino-peptidase activity in the stroma of neoplastic tissue, with a comparison of histochemical techniques. I.nat. Cancer Inst. 23, 857 (1959)
8. Goldberg, J.A., Pineda, E.P. and Rutenburg, A.M.: The measurement of activity of leucine aminopeptidase in serum, urine, bile and tissues. Amer.J.clin.Pathol. 32, 571 (1959)
9. Göggel, K.H., V. Creutzfeld und J. Murneas: Das Verhalten der Leucin-Aminopeptidase und anderer Enzyme im Serum bei Leber-, Gallen- und Pankreaserkrankungen. Dtsch.med. Wschr. 85, 1756, 1808, (1960)
10. Green, M.N., K.C. Tsou, R. Bressler, and A.M. Seligman: The colorimetric determination of leucine aminopeptidase activity with L-leucyl- $\beta$ -naphthylamide hydrochloride. Arch.Biochem. 57, 458 (1955)
11. Grimm, F.C. and Doherty, D.G.: Properties of the two forms of malic dehydrogenase from beef heart. J. Biol. Chem. 236, 1980 (1961)

12. Hanson, H., P. Bohley und H. G. Mannfeldt: Zur Verwendung von L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid als spezifisches Substrat für Bestimmungen von Leucin-aminopeptidase. Clin. chim. Acta (Amst.) 8, 555 (1963)
13. Jung, G. und H. Held: Über Fermente in der Follikelflüssigkeit. Arch. Gyn. 192, 146 (1959)
14. Jung, G.: Untersuchungen über proteolytische Enzyme des Ovariums. Habilitationsschrift Tübingen 1962
15. Kalckar, H. M. in Colowick, S. P. and N. O. Kaplan: Methods in Enzymology. Vol. III Preparation and Assay of Substrates. S. 454.
16. Kleine, R. und H. Hanson: Untersuchungen zur Aktivität und Spezifität der Aminosäureesterwirkung der Augenlinse. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 326, 106 (1961)
17. Kowlessar, O. D., L. J. Haeffner and M. H. Sleisenger: Localization of leucine aminopeptidase in serum and body fluids by starch gel electrophoresis. J. clin. Invest. 39, 671 (1960)
18. Linderstrøm-Lang, K.: Über Darmerepsin. Z. Physiol. Chem. 182, 151 (1929)
19. Meade, B. W. and S. B. Rosalki: Localization of leucine aminopeptidase isoenzymes. J. clin. Pathol. 17, 61 (1964)
20. Nachlas, M. M., D. T. Crawford, and A. M. Seligman: The histochemical demonstration of leucine aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem. 5, 264 (1957)
21. Nagel, W., und F. Willig: Verteilung von proteolytischen Enzymen in Organen und Zellbestandteilen. Naturwissenschaften 51, 115 (1964)
22. Nagel, W., F. Willig und F. Schmidt: Über die Aminosäurearylamidase- (sog. Leucinaminopeptidase-) Aktivität im menschlichen Serum. Klin. Wschr. 42, 447 (1964)
23. O'Connell, W. and R. J. Winzler: Studies on an enzyme in human serum which hydrolyses L-leucyl- $\beta$ -naphthylamide. Cancer Res. 23, 78 (1963)
24. Patterson, E. K.: Diskussionsbeitrag, Proc. Histochem. Soc. J. Histochem. Cytochem. 10, 674 (1962)
25. Rettenbach-Däubner, H. und H. Rieder: Zur diagnostischen Bedeutung der Leucinaminopeptidase. Wiener klin. Wschr. 76, 344 (1964)

26. Rutenburg, A., Goldbarg, A. and E. Pineda: Leucine Amino-peptidase Activity. Observations in patients with cancer and other diseases. New.Engl.J.Med. 259, 469 (1958)
27. Schobel, B.: Die Auftrennung der Amino-peptidasen im Strkegel. Mitt.Enzym-Kolloquium I. Med. Kl. Wien.
28. Schobel, B., und F. Wewalka: Die Heterogenitt der Leucinamino-peptidase, Untersuchungen von Organen und Serum bei Leber-, Gallen-, und Pankreaserkrankungen. Klin. Wschr. 40, 1048 (1962)
29. Schobel, B., und F. Wewalka: ber die sogenannte Leucinamino-peptidase der Duodenalschleimhaut und des Duodenal-saftes. Klin. Wschr. 42, 628 (1964)
30. Schwgerle, G.: Glycylglycin-Dipeptidase und Leucinamino-peptidase im Ovar des Menschen und des Schweines. Diss. Schr. Tbingen 1963
31. Smith, E. E. in Colowick, S. P., and N. O. Kaplan: Methods in Enzymology. Volume II, 91 (N. Y.) 1955
32. Smith, E. E. and W. J. Polyglase: The specificity of Leucine-Amino-peptidase. J. Bio. Chem. 180, 1209 (1949)
33. Smith, E. E., E. P. Pineda, and A. M. Rutenburg: Localization of serum leucine amino-peptidase activity by paper electrophoresis. Proc. Soc. exp. Bio. (N. Y.) 110, 683 (1962)
34. Smith, E. E., and A. M. Rutenburg: Electrophoretic behavior of an amino-peptidase of human tissues and serum. Nature (London) 197, 800 (1963)
35. Spackman, D. H., E. E. Smith, and D. Brown: Leucine amino-peptidase. IV. Isolation and properties of the enzyme from swine kidney. J. biol. chem. 212, 255 (1955)
36. Unbehaun, V., G. Jung und E. Kidess: Vortrag 35. Kongre/Gesellschaft Gynkologie 1964 Arch. Gyn. im Druck
37. Wintersberger, E., und H. Tuppy: Zonenelektrophorese von Amino-peptidasen in Strkegel. Mh. Chem. 91, 406 (1960)
38. Wolff, J. B. and R. A. Resnik: Amino-peptidase of ocular lens. I. Metal-ion requirements and synergistic activation. Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 73, 588 (1963)
39. Wolff, J. B. and R. A. Resnik: s. o. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 73, 613 (1963)

## LEBENS LAUF

Am 31. Dezember 1939 wurde ich, Ulrich Mahler, als Sohn des Dipl.-Volkswirtes Helmut Mahler und seiner Ehefrau Ursula, geb. Huber in Bielefeld geboren.

Nach Besuch des städtischen Helmholtz-Gymnasiums in Hilden bestand ich Ostern 1961 das Abitur.

In Freiburg/Breisgau begann ich Medizin zu studieren. Nach einem Sommersemester in Wien wechselte ich 1964 an die Universität Tübingen über, wo ich mein Studium mit dem Staatsexamen im April 1967 beendete.







